

修 士 学 位 論 文

分裂酵母*fbp1*遺伝子座における 転写抑制時の クロマチン再構築機構の解明

指導教授 廣田 耕志 教授

平成 29 年 2 月 17日 提出

首都大学東京大学院

理工学研究科 分子物質化学専攻

学修番号 15880306

氏 名 梅田 未来

学位論文要旨（修士（理学））

梅田 未来

分裂酵母 *fbp1* 遺伝子座における 転写抑制時のクロマチン再構築機構の解明

【序論】

真核生物のゲノム DNA はクロマチン構造をとり、高度に凝集しているが、その構造はダイナミックに変化している。このクロマチン構造の変化が、転写などの DNA を鋳型とする反応を制御していることが近年明らかになってきた。我々は、分裂酵母の *fbp1* 遺伝子座をモデル系に、クロマチン構造と転写の制御メカニズムの研究を行ってきた。*fbp1* 遺伝子は、グルコース飢餓ストレスに応答し転写が活性化するので、培地中のグルコース濃度を変えるだけで転写状態を制御することができる。そのため、転写調節におけるクロマチン制御の分子機構研究の良いモデルアッセイ系として用いられている。これまでに当研究室では、*fbp1* の転写活性化時に、長鎖非コード RNA の転写を伴いながら *fbp1* プロモーター領域のクロマチン構造が上流から順次再編成されていくことを見出した[1]。また、これらの現象が、3 種の転写活性化因子と Tup11/12 corepressors による拮抗的な制御によって調節されていることも明らかとなった[2]。しかしながら、転写が活性化した後、転写を終結させ、クロマチンを元の密な構造に再構築する機構は未解明のままであった。そこで、本研究では、*fbp1* の転写を活性化させた後、グルコースの豊富な培地に分裂酵母を移し、転写が抑制されときの転写活性化因子と Tup corepressors の働きに焦点をあて、転写活性化後に環境が常態となった時にクロマチンを再構築する機構を解明することを目的とした。

【結果・考察】

分裂酵母をグルコースの豊富な培地に移すと、転写装置である RNA polymerase II がプロモーター領域より 10 分で解離し、転写が抑制された。この時のクロマチン構造の変化を球菌ヌクレアーゼという DNA 消化酵素の接近性の変化で評価した。クロマチン構造の解析を行ったところ、転写活性化因子の結合する、UAS1 と呼ばれる領域への球菌ヌクレアーゼの接近性が 10 分で低下した。一方、転写開始点近傍の TATA box における球菌ヌクレアーゼの接近性は徐々に低下し、120 分で常態まで低下した。このことから、*fbp1* の転写抑制時には、クロマチン構造に 2 段階の制御が存在することが示唆された。

次に、ヒストンタンパク質がこの領域に動員されることでクロマチンが再構築されているのか調べる為に、*fbp1* プロモーターにおけるヒストンの結合量を定量した。UAS1 におけるヒストンの結合量が 10 分で回復することが予想されたが、*fbp1* プロモーターのどの領域でも 120 分かけて結合量が回復した。この結果から、UAS1 の球菌ヌクレア

ーゼ接近性の速やかな低下は、ヒストンタンパク質の動員の為ではなく、この領域での転写活性化因子の結合状態の変化に伴うヌクレオソームの配置パターンの変化によるものであることが示唆された。実際に、UAS1 に結合する転写活性化因子 Atf1 は、グルコースの豊富な培地に移して 10 分で低下することがわかった。同様に、*fbp1* 転写に必須である他の転写活性化因子 Rst2 もグルコースの豊富な培地に移して 10 分で低下した。これまでの結果から、UAS1 における球菌ヌクレアーゼ接近性の速やかな低下は、転写活性化因子の解離による、ヌクレオソームの結合パターンの変化を表している一方、TATA box での球菌ヌクレアーゼ接近性の緩やかな（120 分後）低下は、ヒストンタンパク質の動員によるクロマチン再構築を表していることが示唆された。

酵母からヒトまで保存されている、転写共抑制因子 Tup corepressors の転写抑制での機能を調べるため、Tup11/12 欠損株(*tupΔΔ*)を用いて解析を行った。驚くべきことに、*tupΔΔ*では、野生型と同等のクロマチン再構築と転写抑制が行われていた。これらの結果から、Tup corepressors は *fbp1* の転写抑制には必要でないという意外な結論が示唆された。*tupΔΔ*ではグルコース飢餓時の *fbp1* の転写量の増加や、グルコース飢餓以外のストレスでの *fbp1* の非特異的な転写活性化が見られることから[3]、Tup corepressors は転写活性化時の転写量調節や、不用意な *fbp1* 転写の抑制を担っていると考えられる。

本研究では、分裂酵母 *fbp1* の転写抑制時における転写抑制機構およびクロマチン再構築機構の一端を明らかにした。*fbp1* 遺伝子座では、クロマチン再構築に先立って転写抑制され、クロマチン再構築に独立して転写が抑制されることが明らかとなった。一方、出芽酵母において、クロマチンの再構築が行われないと転写の抑制がかからなくなることが報告されている[4]。このことから、分裂酵母における転写抑制とクロマチン構造の関係性は、出芽酵母とは異なることが示唆される。今後、クロマチン再構築機構に着目し、クロマチン再構築を担う因子の同定や、クロマチン再構築が行われない変異体での転写制御機構の解明を推進する。

【参考文献】

- [1] Hirota, K., Miyoshi, T., Kugou, K., Hoffman, C. S., Shibata, T., and Ohta, K.
Stepwise chromatin remodelling by a cascade of transcription initiation of non-coding RNAs. *Nature* 456, 130-135 (2008)
- [2] Asada, R., Takemata, N., Hoffman, C. S., Ohta, K., and Hirota, K.
Antagonistic controls of chromatin and mRNA start site selection by Tup family corepressors and the CCAAT-binding factor. *Mol. Cell Biol.* 35, 847-855 (2015)
- [3] Hirota, K., Hasemi, T., Yamada, T., Mizuno, K., Hoffman, C. S., Shibata, T., and Ohta, K.
Fission yeast global repressors regulate the specificity of chromatin alteration in response to distinct environmental stresses. *Nucleic Acids Res.* 32, 855-862 (2004)
- [4] Adkins, M. W. and Tyler, J.K.
Transcriptional Activators Are Dispensable for Transcription in the Absence of Spt6-Mediated Chromatin Reassembly of Promoter Regions. *Mol. Cell* 21, 405-416 (2006)

目次

略語一覧	2
1 序論	3
1.1 クロマチン構造	3
1.2 転写活性化因子と転写抑制因子	3
1.3 分裂酵母 <i>fbp1</i>	4
1.4 Tup corepressors	4
1.5 本研究の目的	6
2 使用した試薬および実験方法	7
2.1 試薬	7
2.1.1 購入試薬・キット	7
2.1.2 調製試薬	9
2.2 実験で使用した装置	16
2.3 実験に用いた分裂酵母株	17
2.4 実験に用いたプライマー	17
2.5 実験操作	17
3 結果と考察	25
3.1 <i>fbp1</i> 転写の抑制に伴うプロモーター領域のクロマチン構造の変化	25
3.2 <i>fbp1</i> プロモーターにおける徐なクロマチン再構築	27
3.3 転写活性化因子の速やかな解離	29
3.4 転写抑制因子 Tup11/12 の欠損株における転写抑制	30
3.5 Tup11/12 欠損株における <i>fbp1</i> プロモーターのクロマチン再構築	30
3.6 プロモーターのクロマチン構造による転写開始の阻害	32
3.7 まとめと考察	33
4 参考文献	35
謝辞	38

略語一覽

AcOH	acetic acid
bp	base pairs
BSA	bovine serum albumin
ChIP	chromatin immunoprecipitation
dCTP	deoxycytidine triphosphate
DDW	distilled deionized water
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EtOH	ethanol
HDAC	histone deacetylase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IP	immunoprecipitation
KOAc	potassium acetate
Kan	kanamycin
MeOH	methanol
MNase	micrococcal nuclease
MOPS	3-morpholinopropanesulfonic
NaOAc	sodium acetate
ORF	open reading frame
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
qPCR	quantitative PCR
RNAP II	RNA polymerase II
rpm	rotation per minute
RT	room temperature
SDS	sodium dodecyl sulfate
TBS	tris-buffered saline
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
UAS	upstream activation sequence
2ME	2-mercaptoethanol

序論

1.1 クロマチン構造

真核生物では、ゲノム DNA はクロマチン構造をとっており、核内に高度に凝集した状態で存在する。クロマチン構造は、2 つの H2A-H2B ダイマーと (H3-H4)₂ テトラマーからなるコアヒストンに DNA が約 2 周巻付いたヌクレオソームを基本構造とし、それが折り畳まれた構造である。コアヒストンには、カノニカルヒストンの他にヒストンバリエーションと呼ばれる、カノニカルヒストンと数アミノ酸残基だけ異なるヒストンタンパク質も存在し、ヒストンバリエーションの含まれるヌクレオソームはそれぞれ性質が異なる¹。巨大な分子であるゲノム DNA はクロマチン構造をとることで微小な核内に収納されている反面、密な構造は DNA を鋳型とする反応に対しては阻害的に働く。しかし、細胞はクロマチン構造を変化させることで転写や組換え、DNA 複製、DNA 修復といった反応を制御している²。

クロマチン構造の変化は、ヒストンの化学修飾や、ATP 依存性クロマチンリモデリング因子、ヒストンシャペロンによって引き起こされる¹⁻³。クロマチンの構成因子であるヒストンの N 末端領域はヌクレオソームから飛び出しており、メチル化やアセチル化など、様々な化学修飾を受ける。例えば、転写が活性化している遺伝子のプロモーター領域では H3 のアセチル化、ORF 内部の 5' 側では H3K4 のトリメチル化、ORF 全体で H3K36 のトリメチル化が起こる。一方、転写が抑制されているヘテロクロマチン領域では H3K9 や K27 がメチル化されている²。DNA に損傷が入った時には、H2A バリエーションの一種である H2A.X がリン酸化され、DNA 修復が行われる⁴。ATP 依存性クロマチンリモデリング因子は、アセチル化やメチル化を受けたヒストンを認識するブロモドメインやクロモドメインをもち、ヒストンの交換やヌクレオソームの除去を担う^{5,6}。ヒストンシャペロンが除去されたヒストンを受け取る⁷。また、ヒストンシャペロンは転写や DNA 複製時のヌクレオソーム再形成やヒストンの交換も担う³。このように、ヒストンの化学修飾や ATP 依存性クロマチンリモデリング因子、ヒストンシャペロン等によるクロマチン構造の変化を介し、DNA を鋳型とする反応は制御されている。

1.2 転写活性化因子と転写抑制因子

真核生物では、転写を行う際にクロマチン構造が阻害的に働くため、クロマチン構造を緩ませる必要がある⁸。遺伝子間領域には転写を制御するコンセンサス配列が存在する。そこにその配列を認識する DNA 結合タンパク質が結合する。このタンパク質のうち、転写を活性化させるものを転写活性化因子、抑制するものを転写抑制

因子と呼ぶ。転写活性化因子または転写抑制因子が結合すると、coactivators や corepressors がリクルートされる^{9,10}。これらは、遺伝子間領域のヒストンの修飾状態を変化させ、ATP 依存性クロマチンリモデリング因子によってヌクレオソームの除去やスライディングを受けやすくしたり、ヌクレオソームを安定化させたりする。他にも、coactivators はエンハンサーと転写開始複合体の双方と相互作用し、転写を活性化する mediator としての機能も持つ⁹。

1.3 Tup corepressors

分裂酵母の Tup11/12 は酵母からヒトまで保存されている Global corepressors であり、ヒトでは TLE、ショウジョウバエでは Groucho、出芽酵母では Tup1 と呼ばれている^{10,11}。Tup1 はストレス応答遺伝子や代謝反応に必要な遺伝子など、様々な遺伝子の抑制を担っている¹²。Tup1 はヒストン脱アセチル化酵素である HDAC と相互作用し、抑制的なクロマチン形成に寄与する^{13,14}。出芽酵母の Tup1 欠損による表現型が、分裂酵母の Tup11 の発現で抑制されることから¹⁵、分裂酵母の Tup corepressors も抑制的なクロマチン形成に寄与していると考えられる。

近年、分裂酵母の Tup11/12 は転写抑制だけでなく、転写の精密な制御にも関わっていることが明らかになってきた。Tup corepressors の欠損によってストレス応答の特異性が失われ、野生型では応答しないストレスに対して、クロマチン構造の変化を引き起こしたり、転写が活性化したりする¹⁶ことから、Tup corepressors は正確な転写制御に重要な役割を果たす。

1.4 分裂酵母 *fbp1*

分裂酵母 *fbp1* は糖新生に必要な fructose-1,6-bisphosphatase をコードしており、グルコース飢餓ストレスに応答して転写が著しく活性化する¹⁶。*fbp1* の転写は、転写抑制因子である Scr1 と Tup11/12 によって抑制され、転写活性化因子である Atf1、Rst2、Php2-5 複合体によって活性化される¹⁷⁻¹⁹。細胞外環境に反応するシグナル伝達経路である、MAPK 経路によって Atf1 が活性化し、PKA 経路によって Scr1 と Rst2 が拮抗的な制御を受ける^{18,19}。*fbp1* のプロモーターには UAS1、UAS2 と呼ばれる 2 つの cis elements が存在する¹⁸。UAS1 は cyclic AMP response element (CRE) 配列であり、Atf1 の結合配列である¹⁸。UAS2 は stress response element (STRE) 配列であり、Scr1 と Rst2 の結合配列である¹⁹。PKA 経路が不良になった変異株におけるスクリーニングで Tup11、Tup12、Php5 が *fbp1* の転写制御を行う因子として同定された¹⁷。Tup11、Tup12 は酵母からヒトまで保存されている Global corepressors であり、*fbp1* 上流領域のクロマチン構造の制御を介して転写を制御している^{15,19,20}。Php5 は Php2、Php3 と 3 量体

を形成し、CCAAT という配列に結合することから CCAAT-binding factor (CBF)と呼ばれる²¹。

当研究室では、*fbp1* 転写活性化時に、mRNA の転写に先立って、上流領域からの長鎖非コード RNA の転写と共役したクロマチンリモデリングが起こることを発見した²²。この非コード RNA は少なくとも 3 種類転写されており、*fbp1* の転写活性化に伴って転写開始点が下流へ移行していくものである。また、これらの現象は上述の 3 種の転写活性化因子と Tup corepressors による拮抗的な制御によって調節されていることも明らかとなった²³ (図 1)。グルコースが豊富な環境では、Tup corepressors は転写活性化因子の結合領域 (UAS1、UAS2) のクロマチンが開かないように抑制している (図 1-1 段目)。グルコース飢餓になると Atf1 が UAS1 に結合し、UAS1 と UAS2 における、Tup corepressors のクロマチン構造変化抑制を解除する (図 1-2 段目)。CBF が UAS2 に結合し、Tup corepressors によって抑制されていた TATA 周辺のクロマチン再編成を誘導する。(図 1-3 段目)。TATA 周辺のクロマチンが開いた後、RNAP II の結合を抑制している Tup corepressors を Rst2 が抑制し、転写装置を安定化する (図 1-4 段目)。

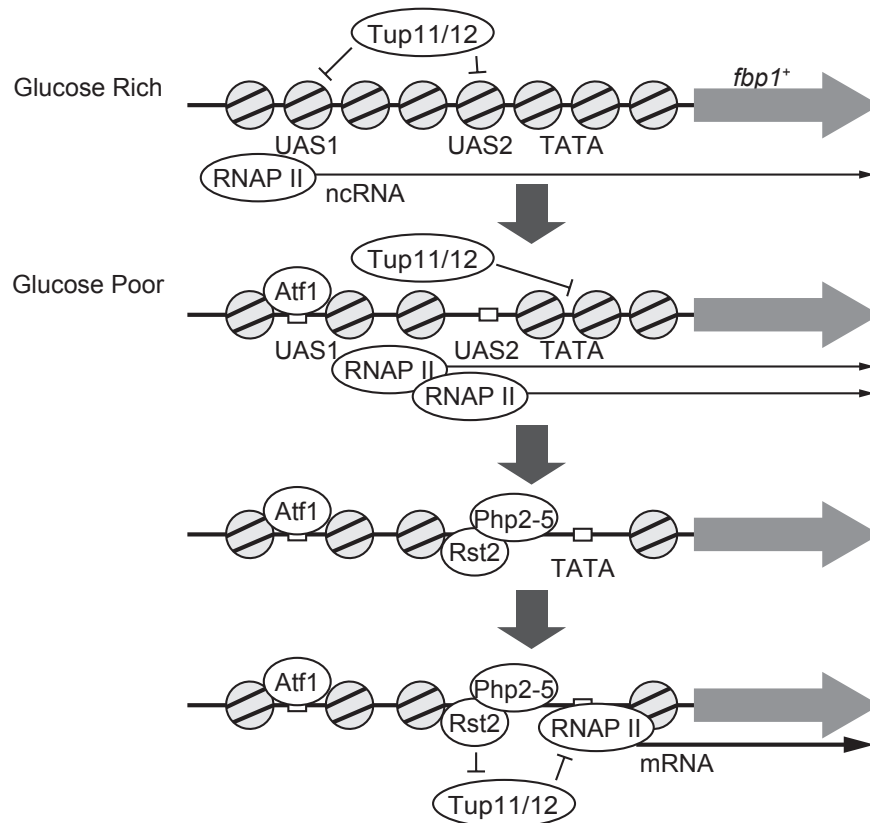


図 1 転写活性化因子と Tup corepressors による拮抗的な制御

グルコースの豊富な培地では *fbp1* プロモーターは密なクロマチン構造をとっており、Tup11/12 によって UAS1、UAS2、TATA のクロマチン構造の変化は抑制されている（1 段目）。グルコース飢餓になると、Atf1 が UAS1、UAS2 における Tup11/12 の抑制を解除する（2 段目）。UAS2 のクロマチンが開くと、Php2-5 が UAS2 に結合し、TATA における Tup11/12 の抑制を解除する（3 段目）。RNAP II の結合を抑制する Tup11/12 を Rst2 が抑制し、転写装置を安定化する（4 段目）。

1.5 本研究の目的

細胞は細胞外の環境の変化に応じて遺伝子の発現を調節する必要がある。遺伝子の転写調節において、細胞にストレスが与えられた時に転写を活性化させる際の分子機構はよく研究されている。一方で、細胞はストレスがなくなれば、その転写を抑制する必要があるにもかかわらず、その分子機構は未解明のままである。本研究では、分裂酵母 *fbp1* 遺伝子座をモデル系に用い、*fbp1* の転写を活性化させたあと、グルコースの豊富な培地に移し、転写が抑制される際の転写活性化因子と Tup corepressors の働きに焦点をあて、転写抑制時にクロマチンを再構築する機構を解明することを目的として研究を行った。

2 使用した試薬および実験方法

2.1 試薬

2.1.1 購入試薬・キット

試薬名	
10x H buffer	TaKaRa
10x Loading Dye	TaKaRa
10x M buffer	TaKaRa
2-mercaptoethanol (分子生物学用)	和光純薬
2-propanol (試薬特級)	和光純薬
5x PS GXL buffer	TaKaRa
Acetic acid (試薬一級)	和光純薬
Adenine (試薬一級)	和光純薬
Agarose	ナカライテスク
Amersham Megaprime DNA Labeling System, dCTP	GE
Anti-ATF1-S.pombe	abcam
Anti-DYKDDDDK tag	和光純薬
Anti-Histone H3	abcam
Anti-RNA polymerase II CTD4H8	Millipore
Bacto Agar	BD
Bacto Tryptone	BD
Bacto Yeast Extract	BD
Bromophenol Blue	和光純薬
BSA	ナカライ
CaCl ₂ ·2H ₂ O (試薬特級)	和光純薬
Clal	NEB
cOmplete EDTA-free	Roche
D-sorbitol (試薬一級)	和光純薬
D (+) -glucose (試薬特級)	和光純薬
dNTP mix	TaKaRa
Dynabeads ProteinA	Thermo Fisher Scientific
EcoRI	TaKaRa
EDTA·2Na	同仁化学研究所
Ethanol (試薬特級)	和光純薬

Ethidium bromide	Molecular Probes
EGTA	東京化学工業
Ficoll PM400	GE
Formaldehyde solution (分子生物学用)	和光純薬
Formamide	ナカライテスク
Glycerol (試薬特級)	和光純薬
Glycine	和光純薬
Glycogen	Roche
H ₃ PO ₄ (試薬特級)	和光純薬
HCl (試薬特級)	和光純薬
HEPES	SIGMA
Hoechst 33258	同仁化学研究所
IGEPAL CA-630	SIGMA
illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns	GE
K ₂ HPO ₄ (試薬特級)	和光純薬
Kanamycin sulfate (生化学用)	和光純薬
KCl (試薬特級)	和光純薬
KH ₂ PO ₄ (試薬特級)	和光純薬
KOH (試薬特級)	和光純薬
LiCl (分子生物学研究用)	ナカライテスク
Methanol (試薬一級)	和光純薬
MgCl ₂ ·6H ₂ O (試薬特級)	和光純薬
MgSO ₄ (試薬特級)	和光純薬
MNase (Nuclease S7)	Roche
MOPS	SIGMA
Na deoxycholate	SIGMA
Na ₂ HPO ₄	国産化学
NaCl (試薬特級)	和光純薬
NaOAc·3H ₂ O (試薬特級)	和光純薬
NaOH (試薬特級)	和光純薬
Orange G	WALDECK
pCR-Blunt II-TOPO	invitrogen
Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1)	ナカライテスク
Phenylmethansulfonyl fluoride	SIGMA

Prime STAR GXL	TaKaRa
Proteinase K	和光純薬
QIAquick Gel Extraction kit	QIAGEN
RNase A	ナカライテスク
SDS	ナカライテスク
THUNDERBIRD SYBR qPCR mix	TOYOBO
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (試薬特級)	和光純薬
Trisodium citrate dihydrate (試薬特級)	和光純薬
TRITON X-100	MP Biomedicals
X-gal (生化学用)	和光純薬
Xylene cyanol FF	和光純薬
Zymolyase-100T	ナカライテスク
α 32 P-dCTP	パーキンエルマー
λ -EcoT14I digest	TaKaRa

2.1.2 調製試薬

● 50x TAE

試薬名	使用量
Tris	242g
AcOH	57.1mL
0.5M EDTA pH8.0	100mL
計	1L

● 10x TE

試薬名	濃度
Tris-HCl pH8.0	100mM
EDTA	10mM

調整後オートクレーブにかけた。

● LB 培地

試薬名	使用量
Trypton	10g
Yeast Extract	5g
NaCl	5g
5M NaOH	200 μ L
計	1L

調整後オートクレーブにかけた。寒天培地を作製する際には、オートクレーブ前に Agar を 20g/L 加えた。薬剤で選択を行う際にはオートクレーブ後に 50mg/mL の Kanamycin を 1000 倍希釈になるよう加えた。

● 2M Mg solution

試薬名	濃度
MgCl ₂	1M
MgSO ₄	1M

濾過滅菌を行った。

● SOC

試薬名	使用量
Trypton	20g
Yeast Extract	5g
5M NaCl	2mL
2.5M KCl	1mL
計	980mL

調整後オートクレーブにかけた。オートクレーブ後十分に冷めてから 10mL の 2M Mg solution と 10mL の 2M glucose を加えた。

● ミニプレップ Sol. I

試薬名	濃度
Glucose	50mM
Tris-HCl pH8.0	25mM
EDTA	10mM

調整後オートクレーブにかけた。

● ミニプレップ Sol. II

試薬名	濃度
SDS	1%
NaOH	0.2M

● ミニプレップ Sol. III

試薬名	濃度
KOAc	5M
AcOH	To pH5.2

● YE 培地

試薬名	使用量
Yeast Extract	5g
Glucose	20g
計	1L

調整後オートクレーブにかけた。

アデニン要求性株には adenine を 100 μ g/mL となるように加えた。

● YER 培地

試薬名	使用量
Yeast Extract	5g
Glucose	60g
計	1L

調整後オートクレーブにかけた。

アデニン要求性株には adenine を 100 μ g/mL となるように加えた。

● YED 培地

試薬名	使用量
Yeast Extract	5g
Glucose	1g
Glycerol	30mL
計	1L

調整後オートクレーブにかけた。

アデニン要求性株には adenine を 100 μ g/mL となるように加えた。

● Hybridization buffer

試薬名	使用量
BSA	10g
SDS	70g
Na ₂ HPO ₄	35.49g
H ₃ PO ₄	2mL
0.5M EDTA	2mL
計	1L

● Hybridization wash buffer

試薬名	使用量
SDS	10g
Na ₂ HPO ₄	2.84g
H ₃ PO ₄	0.16mL
0.5M EDTA	2mL
計	1L

● Northern blot resuspend buffer

試薬名	使用量
10% SDS	10mL
5M NaCl	10mL
1M Tris-HCl pH7.5	20mL
0.5M EDTA	2mL
計	100mL

調整後オートクレーブにかけた。

● 10x Northern blot electrophoresis buffer

試薬名	使用量
MOPS	41.86g
NaOAc·3H ₂ O	6.8g
EDTA·2Na	3.72g
NaOH	4g
計	1L

調整後オートクレーブにかけた。

● Northern blot loading dye

試薬名	濃度
Glycerol	50%
EDTA	1mM
Bromophenol blue	0.4%
Xylene cyanol	0.4%

● 20x SSC

試薬名	使用量
NaCl	175.3g
Trisodium citrate dihydrate	88.2g
計	1L

● Pre-incubation buffer

試薬名	使用量
2ME	500μL
1M Tris-HCl pH8.0	200μL
0.5M EDTA	60μL
計	10mL

● Zymolyase solution

試薬名	使用量
Glucose	150mg
1M sorbitol	9mL
0.5M EDTA pH8.0	150μL
Tris-HCl pH7.5	450μL
計	12mL

zymolyase ありの場合は 25mg の zymolyase 100T を加えた。

● MNase lysis buffer

試薬名	使用量
Ficoll PM400	18g
1M KH ₂ PO ₄	1mL
1M K ₂ HPO ₄	1mL
2M MgCl ₂	0.5mL
0.5M EGTA	0.5mL
0.5M EDTA	0.5mL
計	100mL

使用前に PMSF を 1mM となるように加えた。

● MNase buffer A

試薬名	使用量
1M Tris-HCl pH8.0	5mL
5M NaCl	15mL
2.5M KCl	1mL
0.5M EDTA	1mL
計	500mL

調整後オートクレーブにかけた。

使用前に PMSF を 1mM となるように加えた。

● 10x TNE

試薬名	使用量
1M Tris-HCl pH7.5	10mL
NaCl	40mL
0.5M EDTA	2mL
計	100mL

調整後オートクレーブにかけた。

● Orange G loading dye

試薬名	使用量
Orange G	0.3%
EDTA	5mM
Tris-HCl pH7.5	10M

● 10x TBS

試薬名	使用量
1M Tris-HCl pH7.5	200mL
5M NaCl	300mL
計	1L

調整後オートクレーブにかけた。

● 10x PBS

試薬名	濃度
NaCl	137mM
Na ₂ HPO ₄	8.1mM
KCl	2.68mM
KH ₂ PO ₄	1.47mM

調整後オートクレーブにかけた。

● ChIP Lysis 140 buffer

試薬名	使用量
Na deoxycholate	0.2g
0.5M EDTA	0.4mL
1M HEPES-KOH pH7.5	10mL
5M NaCl	5.6mL
Triton X-100	2mL
計	200mL

● ChIP Lysis 500 buffer

試薬名	使用量
Na deoxycholate	0.2g
0.5M EDTA	0.4mL
1M HEPES-KOH pH7.5	10mL
5M NaCl	20mL
Triton X-100	2mL
計	200mL

● ChIP LiCl/detergent buffer

試薬名	使用量
Na deoxycholate	1g
0.5M EDTA	0.4mL
LiCl	2.12g
IGEPAL CA-630	1mL
計	200mL

● ChIP Elution buffer

試薬名	使用量
0.5M EDTA	4mL
10% SDS	20mL
1M Tris-HCl pH8.0	10mL
計	200mL

2.2 実験で使用した装置

装置	
FAS IV	日本ジェネティクス
FLA7000	FUJI FILM
FLUOROSKAN ASCENT FL	Thermo Fisher Scientific
Handy Sonic	TOMY
Micro Vac	TOMY
Mupid-2 plus	ADVANCE
Multi beads shocker	安井器械
Nanodrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific
PCR Thermal Cycler Dice	TaKaRa
Thermal Cycler Dice Real Time System TP800	TaKaRa
VacuGene Pump	Pharmacia Biotech

2.3 実験に用いた分裂酵母株

Strain	Genotype
SPH1	<i>h⁻ leu1-32</i>
SPH13	<i>h⁻ ade6-M26 leu1-32 ura4-D18 tup11::ura4⁺ tup12::ura4⁺</i>
SPH15	<i>h⁻ ade6-M26 leu1-32 tup12-3flag<<kanMX6</i>
SPH20	<i>h⁻ ade6-M26 leu1-32 rst2-3flag<<kanMX6</i>

2.4 実験に用いたプライマー

Name	Sequence (5'-3')
cam1 F	CTACCCGTAACCTTACAG
cam1 R	TGGAAGAAATGACACGAG
fbp1 ORF F	CGCCGATACAATCAGAAGC
fbp1 ORF R	CGATGAGTTTGCAGCATCC
prp3 F	GCACAGTCGTTGTACAAATTCGTATTCCC
prp3 R	ACGATTCTAAACGCCTCTTGTTACGATCC
TATA F	CGCGGAACTAAACATAGCG
TATA R	GCTAGAAACCGAGTGGTG
UAS1 F	GGGATGAAAACAATCAACCTC
UAS1 R	GGAATGCAGCAACGAAAATC
UAS2 F	GGGTGGAATGAGTCCGC
UAS2 R	GTTCCGCGAATCATAAGCC

2.5 実験操作

● PCR

0.2mLPCR チューブに 5x PS GXL buffer (10μL)、2.5mM dNTP mix (4μL)、1.25U/μL Prime STAR GXL (0.5μL)、10μM プライマーF,R (各 1μL)、約 20ng/μL 鋳型 DNA (1μL)、DDW (33μL)を加えた後、PCR thermal cyclers を利用して増幅した。

PCR のプログラムは以下のように行った。

1. 初期変性	98℃	2min	
2. 変性	98℃	30sec	
3. アニールリング	*55℃	30sec	*アニール温度はプライマーの Tm 値
4. 伸長	72℃	1min/kbp	Step 2~4×30cycle
5. 最終伸長	72℃	2min	

- エタノール沈殿

DNA(もしくはRNA)溶液の 1/10 量の 3M NaOAc, pH5.2 と 2.5 倍量の EtOH または等量の 2-プロパノールを加え、よく混和した。15,000rpm、4℃で 5min 遠心分離し、上清を取り除いた。70%EtOH を適量加えて 15,000rpm、4℃で 1min 遠心分離し、上清を取り除いた。風乾または Micro Vac を用いて乾燥後、TE で沈殿を溶解した。

- アガロースゲル電気泳動

TAE buffer の入った電気泳動槽にアガロースゲルを置き、10x Loading buffer を加えた試料をウェルにアプライした。定電圧で泳動後、FAS IV で撮影し、DNA を検出した。

- ゲル精製

PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により分離し、目的断片を切り出した。その後 QIAquick Gel Extraction kit を用いて精製した。

- TOPO クローニング

ゲル精製した PCR 産物 10~20ng (4.5μL)、salt solution (1μL)、pCR-Blunt II-TOPO ベクター (0.5μL)を混和し、室温で 5 分静置した。これにコンピテントセル (DH5 α) (60μL)を加えて形質転換し、40mg/mL の X-gal を 20μL 塗った LB Kan プレートで培養した。生えてきた白いコロニーから、ミニプレップによりプラスミドを抽出した。

- 形質転換 (*E.coli*)

コンピテントセルを氷上で解凍して、DNA 溶液に DNA の 10 倍の液量のコンピテントセルを加え、氷上で 30 分静置した。42℃で 30 秒加熱した後、氷上で 1 分静置した。これに 600μL の SOC を加えて 37℃で 2 時間培養した後、5000rpm、30sec 遠心して上清を約 100μL だけ残し、懸濁したものを LB Kan プレートに塗り、37℃で一晩培養した。

- ミニプレップ

形質転換して生えてきた大腸菌のコロニーを 1.5mL の LB Kan 培地で一晩、37℃で培養した。この培養液を 1.5mL マイクロチューブに移し、15,000rpm、4℃で 1min 遠心分離し、上清を取り除いた。150μL のミニプレップ Sol. I を加え、vortex により混和した。次に 150μL のミニプレップ Sol. II を加え 5 回転倒混和した後、150μL のミニプレップ Sol. III を加えて再び 5 回転倒混和した。15,000rpm、4℃で 1min 遠心分離し、上清を回収した。この上清をエタノール沈殿し、ペレットを 50μL の TE with RNase A で溶解した。

- 制限酵素消化

1.5mL マイクロチューブに基質 DNA、10x Buffer（用いる酵素に適したもの）、制限酵素、DDW を加えて混和し、37℃で消化した。

- フェノールクロロホルム抽出

DNA(もしくは RNA)溶液に等量の Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1)を加えてよく混和した。14,680rpm、RT で 5min 遠心分離し、水層（上層）を回収した。

- プローブ作製

目的の領域を PCR で増幅した後 TOPO クローニングし、インサートが入っていることを確認したプラスミドを用いて、再び同じプライマーを用いて PCR で増幅した。この PCR 産物をゲル精製し、その後電気泳動によりマーカと濃度を比較した。

各プローブは以下のプライマーを用いて作製した

プローブ	プライマー
<i>fbp1</i> ORF	<i>fbp1</i> ORF F, R
<i>cam1</i>	<i>cam1</i> F, R

- ハイブリダイゼーション

Amersham Megaprime DNA Labeling System を用いて、³²P でラベルされた DNA プローブを作製した 1.5mL マイクロチューブに鋳型 DNA プローブ (50ng)と 2.5μL の primer solution を加え、合計 25μL となる様に DDW を加えた。5 分間ボイルした後、室温で冷まし、5μL の labeling buffer を加えた。そこに 2.5μL の α ³²P-dCTP と 1μL の klenow を加えて混和した後、37℃で 15 分間インキュベートした。3,000rpm、RT、1min の遠心分離で buffer を取り除いた G-50 カラムにプローブ溶液を加え、3,000rpm、RT で 3min 遠心分離し、50μL の TE が入った 1.5mL マイクロチューブに移して未反応の α ³²P-dCTP を除去した。この溶液を 5 分間ボイルし、氷上で急冷した。

ハイブリダイゼーションボトルに DNA(もしくは RNA)が転写されたメンブレンを入れ、Hybridization buffer を適量加え、62℃、30 分ローテーションした。Hybridization buffer を交換し、³²P でラベルされた DNA プローブを加え、62℃で一晩ローテーションした。Hybridization buffer を除去し、Hybridization Wash buffer でハイブリダイゼーションボトルをすすいだ。さらに Hybridization Wash buffer を適量加え、62℃で 5 分ローテーションし、洗浄した。これを 3 回繰り返す。メンブレンをトレイに取り出して、さらに 3 回 Hybridization Wash buffer ですすいだ。水気をとったメンブレンをラップで包み、イメージングプレート(BAS2040)とともにカセットにはさみ、FLA7000 で検出した。

- サンプルング (Northern blot、クロマチン解析用)

分裂酵母を 2mL の YE 培地で 30℃、一晩培養し、増殖させた後、350mL の YER 培地で 1.5×10^7 /mL になるまで 30℃で培養した。培養液を 500mL の遠心管に移し、3,000rpm、4℃、5 分遠心分離し、上清を取り除いた。適量の滅菌水を加え、3,500rpm、4℃、1 分遠心分離し、上清を取り除いた。ペレットを YED 培地で懸濁して 350mL の YED 培地に移した。30℃で 3 時間培養後、培養液 50mL を 50mL チューブに移して後述の操作を行い、残りを 500mL 遠心管に移し、3,000rpm、4℃、5 分遠心分離し、上清を取り除いた。ペレットを YER 培地で懸濁して 300mL の YER 培地に移して 30℃で培養した。この時間を 0 分とし、各タイムコースで培養液を 50mL ずつ移し、3,500rpm、4℃、1 分遠心分離し、上清を取り除いた。ペレットを 1mL の DDW で懸濁し、1.5mL マイクロチューブに移した。このうち、100μL を別のチューブに移して、これらを 15,000rpm、4℃、一瞬遠心分離し、上清を取り除き、液体窒素で凍結した。凍結したサンプルのうち、100μL の方を Northern blot 用に、もう一方をクロマチン解析用に使用した。また、60 分おきに 30℃に温めておいた YER 培地を培養液に 50mL ずつ加え、培養液を薄めた。

- Northern blot

回収した分裂酵母サンプルに 300μL の Northern blot resuspend buffer を加えて懸濁し、0.5g の 0.5mm ガラスビーズが入ったマルチビーズショッカー用 2mL チューブに移し、そこに 300μL の Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1)を加え、2,300rpm、30 秒、30 秒休み、3 サイクルの条件で、マルチビーズショッカーを用いて酵母を破碎した。その後、フェノールクロロホルム抽出を 2 回行い、エタノール沈殿 (100%EtOH を加えた段階で-20℃に 2 時間静置した。風乾は室温で 5 分行った。)を行って 40μL の TE に溶解した。Nanodrop で RNA 濃度を測定し、各サンプル 10μg になるように 5μL の RNA を希釈して用意した。そこに 10x Northern blot electrophoresis buffer 2μL、Formaldehyde solution 3μL、ホルムアミド 10μL、EtBr 0.075μL を加えて混和後、60℃で 5 分間インキュベートした。2μL の Northern blot loading buffer を加え、1μL だけ TAE ゲルで電気泳動し、各サンプル間で RNA 量が一定であるかどうかを確認した。RNA 量が一定になるように 10μL 程度を、3%の Formaldehyde solution を含む MOPS ゲルで 100V、定電圧で電気泳動した。ゲルを FAS IV で撮影し、rRNA を確認した後、10x SSC で 10 分間 wash した。厚紙に 10x SSC を吸わせ、厚紙の上にゲル、メンブレン、ろ紙 2 枚、紙タオル 1 束の順で下から上へ重ねた。室温で一晩静置し、メンブレンに RNA を転写した。メンブレンを 80℃、2 時間インキュベートし、メンブレンに RNA を固定した。このメンブレンを、³²P でラベルした目的のプロンプでハイブリダイゼーションし、目的の

RNA を検出した。

- Hoechst による DNA 濃度測定

10x TNE 500 μ L、1mg/mL Hoechst 33258 0.5 μ L、DDW 4.5mL を混合して pre-mix を作製した。検量線用に 250ng/ μ L、125ng/ μ L、62.5ng/ μ L、31.25ng/ μ L の λ -EcoT14 I digest を用意した。96well プレートに検量線用サンプルと測定したい DNA サンプル、ブランクとして用いる DDW を各 2 μ L ずつ入れ、そこに pre-mix を 200 μ L ずつ加えた。Hoechst による蛍光を FLUOROSKAN ASCENT FL を用いて測定し、検量線から DNA 濃度を定量した。

- クロマチン解析

回収した分裂酵母サンプルに pre-incubation buffer をペレットの 2 倍量加え、vortex により懸濁した後、30°C で 10 分間インキュベートした。3,500rpm、4°C、5 分遠心分離し、上清を取り除いた後、1mL の 1M sorbitol、20 μ L の 0.5M EDTA を加えて vortex により懸濁した。3,500rpm、4°C、5 分遠心分離し、上清を取り除いた後、zymolyase の入っていない 500 μ L の zymolyase solution を加え、vortex により懸濁した。そこに zymolyase 入りの zymolyase solution 500 μ L を加えて混和した後、30°C で 5 分間インキュベートした。3,500rpm、4°C、5 分遠心分離し、上清を取り除いた後、1mL の 1M sorbitol を加え、ピペッティングにより懸濁した。3,500rpm、4°C、5 分遠心分離し、上清を取り除いた後、1mL の MNase lysis buffer で懸濁した。13,000rpm、4°C、30 分遠心分離し、上清を取り除いた後、1.5mL の Buffer A で懸濁し、3 本の 1.5mL マイクロチューブに 500 μ L ずつ分注した。それぞれに 5 μ L の 1M CaCl₂ を加えて混和した後、各チューブに 0、1、2.5 μ L の 10U/mL の MNase を加え、37°C で 5 分インキュベートした。その後 40 μ L の 0.5M EDTA を加えて MNase の反応を停止させた。50 μ L の 10% SDS、10 μ L の 20mg/mL Proteinase K、5 μ L の 2ME を加えて混和し、55°C で一晩インキュベートした。15,000rpm、4°C、15 分遠心分離して上清を回収し、フェノールクロロホルム抽出を行った上清を 2-プロパノールを用いてエタノール沈殿し、ペレットを 200 μ L の TE with RNase A に溶解した。37°C で 30 分インキュベートした後、フェノールクロロホルム抽出を行い、2-プロパノールでエタノール沈殿し、ペレットを 50 μ L の TE に溶解した。Hoechst を用いて DNA 濃度を測定し、1 μ g の DNA を 100 μ L スケールで Cla I 消化した。エタノール沈殿を行い、TE で 5 倍希釈した Orange G loading dye 5 μ L に溶解した。これを 40cm の 1.5% TAE アガロースゲルを用いて 60V、定電圧で 20 時間電気泳動した。吸引装置を用いてメンブレンに DNA を転写し、ハイブリダイゼーションにてクロマチン構造を解析した。プローブは *fbp1* ORF を用いた。

- ゲノムとり

クロマチン解析の MNase 0U/mL のサンプルと同じ方法でゲノムを回収した。
このゲノムはクローニングや、後述の qPCR の検量線用の鋳型として用いた。

- クロマチン免疫沈降 (ChIP)

〈Cell lysate の作製〉

分裂酵母を 2mL の YE 培地で一晚培養し、増殖させた後、400mL の YER 培地に移して 1.5×10^7 /mL になるまで 30°C で培養した。グルコース飢餓前のサンプルとして培養液 50mL を 50mL チューブに移して後述の操作を行い、残りを 500mL の遠心管に移し、3,000rpm、4°C、5 分遠心分離し、上清を取り除いた。適量の滅菌水を加え、3,500rpm、4°C、1 分遠心分離し、上清を取り除いた。ペレットを YED 培地で懸濁して 350mL の YED 培地に移した。30°C で 3 時間培養後、培養液 50mL を 50mL チューブに移して後述の操作を行い、残りを 500mL 遠心管に移し、3,000rpm、4°C、5 分遠心分離し、上清を取り除いた。ペレットを YER 培地で懸濁して 300mL の YER 培地に移し、30°C で培養した。この時間を 0 分とし、各タイムコースで培養液を 50mL ずつ移し、1.4mL の Formaldehyde solution を加え、よく混和した後、室温で 20 分間放置した(*tup4Δ* 株を用いたときは細胞が沈まないようにチューブをローテーションした)。その後、2.5mL の 2.5M グリシンを加えて混和し、3,500rpm、4°C、1 分遠心分離し、上清を取り除いた。20mL の冷えた TBS で wash して 3,500rpm、4°C、1 分遠心分離し、上清を取り除く操作を 2 回行った。ペレットを 700μL の冷えた TBS で懸濁し、1.5mL マイクロチューブに移して、15,000rpm、4°C、一瞬遠心分離し、上清を取り除いて、液体窒素で凍結した。また、60 分おきに 30°C に温めておいた YER 培地を培養液に 50mL ずつ加え、培養液を希釈した。

ホルムアルデヒドで固定した分裂酵母サンプルに 400μL の Lysis buffer 140、8μL の 50x complete を加えて懸濁し、0.5mm、0.6mL のジルコニアビーズが入った、マルチビーズショッカー専用 2mL チューブに移した。2,480rpm、30 秒、30 秒休み、5 サイクルの条件を 4 回繰り返し、マルチビーズショッカーで細胞を破碎した。2mL チューブの底に画鋏で穴をあけ、3,500rpm、4°C、1 分、スイングローターで遠心分離し、懸濁液を 1.5mL チューブに回収した。Handy Sonic を用いて、ダイヤル 8、30 秒の条件で、サンプルを氷水で冷やしながら 6 回ソニケーションを行った。15,000rpm、4°C、15 分遠心分離し、上清を 1.5mL チューブに回収して IP サンプルとして使用し、そのうち、1%(ヒストン抗体の時は 5%)を Input サンプルとして使用した。

〈免疫沈降 (IP)〉

1.5mL チューブに 20μL/サンプルの Dynabeads Protein A を加え、磁気フォルダーを用

いて上清を分離し、取り除いた。ビーズを 500 μ L の PBS/0.5% BSA で 2 回 wash し、50 μ L/ サンプルの PBS/0.5% BSA でビーズを懸濁し、1 μ L/サンプルの任意の抗体を加え、4 $^{\circ}$ C で一晩ローテーションした。その後、磁気フォルダーを用いて上清を分離し、取り除いた。ビーズを 500 μ L の PBS/0.5% BSA で 2 回 wash し、50 μ L/サンプルの PBS/0.5% BSA でビーズを懸濁し、IP 用に調製した上記の cell lysate を加えて懸濁した後、4 $^{\circ}$ C で一晩ローテーションした。その後、磁気フォルダーを用いて上清を分離し、回収したこのうち、100 μ L を Sup サンプルとして使用した。残った磁気ビーズを、それぞれ 500 μ L の Lysis buffer 140 で 2 回、Lysis buffer 500 で 1 回、LiCl/detergent buffer で 2 回、TE で 1 回 wash した。磁気フォルダーを用いて上清を完全に除去した後、40 μ L の Elution buffer で懸濁し、65 $^{\circ}$ C で 10 分インキュベートした。その後、磁気フォルダーを用いて上清を新しい 1.5mL チューブに回収した。残ったビーズに 100 μ L の Elution buffer、150 μ L の TE/0.67% SDS を加えて懸濁した。65 $^{\circ}$ C で 15 分インキュベートし、磁気フォルダーを用いて上清を先程の 1.5mL チューブに回収した。回収した上清に 4.2 μ L の 20mg/mL Proteinase K を加えて混和後、37 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。

〈Sup サンプルの調製〉

100 μ L の上清に 390 μ L の Lysis buffer 140、10 μ L の 0.5M EDTA、4.2 μ L の 20mg/mL Proteinase K を加えて混和後、37 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。

〈Input サンプルの調製〉

Input 用に回収した cell lysate に合計で 100 μ L になるように Lysis buffer 140 を加えた。さらに、400 μ L の TE/1% SDS、4.2 μ L の 20mg/mL Proteinase K を加えて混和後、37 $^{\circ}$ C で一晩以上インキュベートした。

〈DNA の精製〉

Proteinase K 処理した各サンプルを 65 $^{\circ}$ C で 6 時間インキュベートした。IP サンプルには 210 μ L の TE を加えた。IP サンプルと Input サンプルには 1 μ L の 20mg/mL グリコーゲンを加え、フェノールクロロホルム抽出を 2 回行った。その後、エタノール沈殿を行い (3M NaOAc、100%EtOH を加えた段階で-20 $^{\circ}$ C に 2 時間静置)、30 μ L (Sup サンプルは 50 μ L) の TE with RNase A に溶解した。37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。Sup サンプルをアガロースゲル電気泳動し、DNA が 400bp 程度に切断されていることを確認した。

〈DNA の定量〉

qPCR により、IP サンプルと Input サンプルの DNA 量を定量した。1 サンプルあたり、DNA 1 μ L、10mM プライマー 各 0.6 μ L、THUNDERBIRD SYBR qPCR mix 10 μ L、DDW 7.8 μ L を 96well PCR Plate (バイオ・リジェネレーションズ)に入れて混ぜ、Thermal Cycler

Dice Real Time System TP800 を用いて定量した。PCR は以下のプログラムで行った。

1. 初期変性	95℃	30sec	
2. 変性	95℃	5sec	
3. アニール	*55℃	10sec	*アニール温度はプライマーの Tm 値
4. 伸長	72℃	30sec	Step 2~4×45cycle
5. 最終伸長	72℃	2min	
	95℃	15sec	
6. 融解曲線分析	60℃	30sec	
	95℃	15sec	

プライマーは UAS1 F, R、UAS2 F, R、TATA F, R、fbp1ORF F, R、prp3 F, R を用いた。

3 結果と考察

3.1 *fbp1* 転写の抑制に伴うプロモーター領域のクロマチン構造の変化

fbp1 の転写が抑制される際、そのプロモーター領域でクロマチン構造がどのように変化するのかを調べた。まず、*fbp1* の転写抑制にどれくらいの時間がかかるのかを調べる為に、Northern blot で *fbp1* mRNA を検出した。*fbp1* mRNA は YER 培地に移してからすぐに減少し始め、60 分では検出されなくなった (図 2-A)。新たな転写が起こらなくなるタイミングを調べる為に、転写装置である RNAP II の TATA における結合をクロマチン免疫沈降法で調べた。内部コントロールとして、グルコース飢餓ストレスによって応答しない *prp3* 領域で標準化した。RNAP II は YER 培地に移して 10 分で TATA box から脱離した (図 2-B)。このことから、細胞は培地中のグルコース濃度に応答し、*fbp1* の転写抑制は 10 分で行われることが明らかとなった。

また、この時のクロマチン構造を可視化するために、球菌ヌクレアーゼを用いてクロマチンを部分的に消化し、解析した。球菌ヌクレアーゼはクロマチン構造の密な箇所は切断できないが、クロマチンの緩んだ部分、特にヌクレオソームのリンカー部分を選択的に消化するため、クロマチン構造の疎密をバンドの有無で評価できる。グルコース飢餓にさらされると、プロモーターのクロマチン構造は上流から段階的に緩んでいき、最終的に TATA box 周辺のクロマチンが大きく開くことが先行研究で明らかにされている¹⁸。YED 培地から YER 培地に移したところ、10 分で転写活性化因子の結合領域である UAS1 のバンドが消失した (図 2-C, 黒矢頭、図 2-D)。一方、TATA box のバンドは 120 分で消失した (図 2-C, 灰矢頭、図 2-E)。これらの結果より、*fbp1* 転写抑制時のクロマチン再構築は 10 分で行われる速い反応と、120 分程度かかる遅い反応の 2 段階で制御されていることが示唆された。

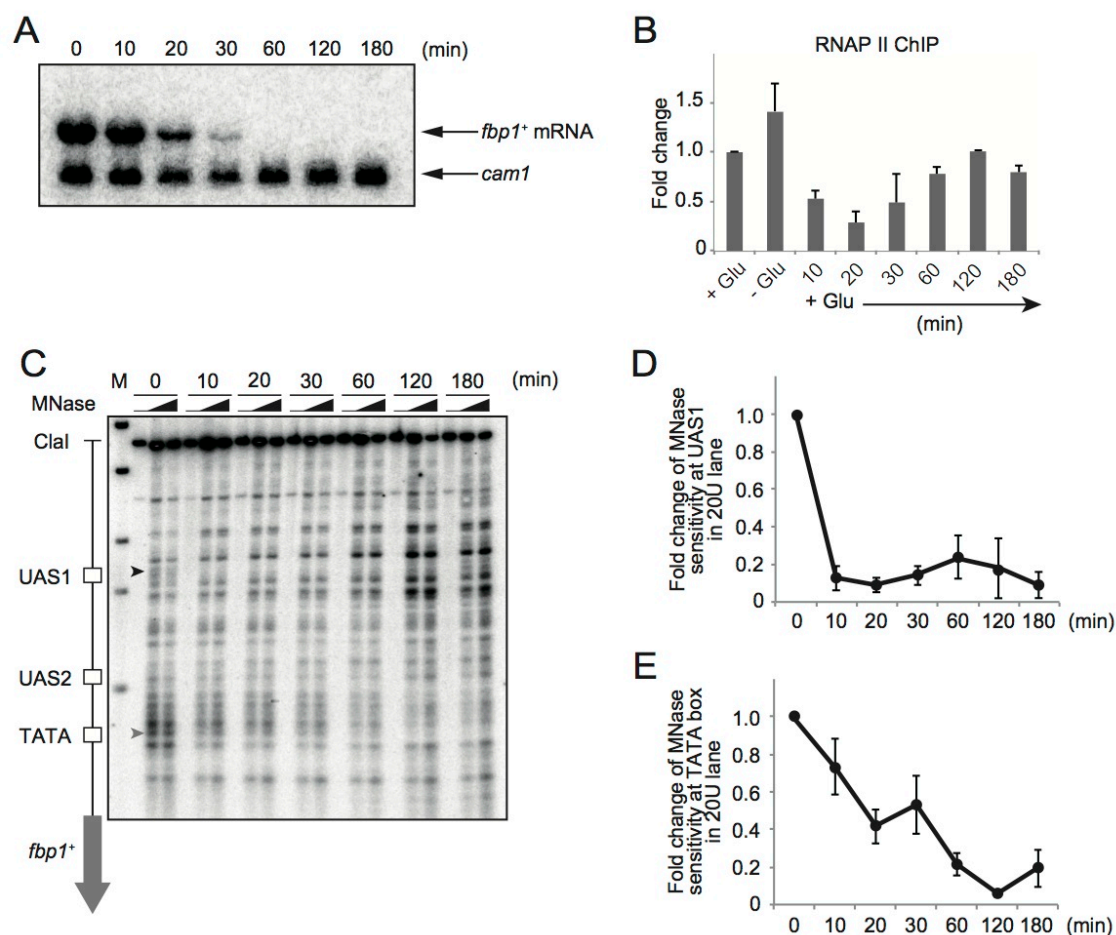


図 2 *fbp1* 転写抑制時のクロマチン構造変化

(A) グルコース飢餓からグルコースの豊富な培地に移した後、示された時間で野生型分裂酵母を回収し、Northern blotを行った。*fbp1* mRNA は *fbp1* ORF プローブ、コントロールとして *cam1* mRNA を *cam1* プローブで検出した。

(B) グルコース飢餓からグルコースの豊富な培地に移した後の、野生型における RNA polymerase II の *fbp1* プロモーターへの結合量の解析。示された時間で分裂酵母をホルムアルデヒドでクロスリンクしたサンプルに対し、RNA polymerase II CTD 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、共沈降した DNA を TATA プライマーでリアルタイム qPCR により定量した。内部コントロールとして *prp3* 領域を用い、標準化した。+Glu、-Glu はそれぞれ、グルコース飢餓に移す前とグルコース飢餓 3 時間 (図 2-A の 0min に相当) のサンプルである。グルコース飢餓前からの変化量をグラフに示した。

(C) 野生型のクロマチン解析の結果。図 2-A と同じタイムコースでサンプルを回収し、クロマチン解析を行った。上部 MNase の欄は用いた MNase の量を模式的に表した (0, 20, 50U/mL)。左端にバンドの位置関係を示した。

(D, E) UAS1 と TATA box におけるクロマチン構造変化の定量結果。図 2-C の 20U のレーン全てと矢頭で示したバンドの定量を行い、その比を計算した。各領域の 0min からの変化量をグラフに示した。

3.2 *fbp1* プロモーターにおける徐なクロマチン再構築

上述のクロマチン解析における球菌ヌクレアーゼ切断部位の消失が、ヌクレオソーム再構築によるものであるのか、ヌクレオソームの配置パターンの変化によるものであるのかを調べる為、ヒストン H3 抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行い、*fbp1* プロモーター領域の UAS1、UAS2、TATA、*fbp1* ORF でのヒストン H3 の結合量の変化を調べた (図 3-A)。*fbp1* 転写活性化時には、上流から段階的にヒストンが除去され、クロマチン構造が開く (Hirota *et al.* unpublished data)。球菌ヌクレアーゼのクロマチン解析では、UAS1 領域の球菌ヌクレアーゼ切断部位が YER 培地に変えて 10 分で消失したことから (図 2-C)、UAS1 におけるヌクレオソーム再構築は 10 分で完了することが予想された。しかしながら、YER 培地に変えて 10 分では、UAS1 におけるヒストンの結合量はほとんど回復せず、120 分でグルコース存在時のヒストン結合量まで回復した (図 3-B)。また、*fbp1* プロモーターの他の領域でも、同様に 120 分でグルコース存在時のヒストン結合量まで回復した (図 3-C, D)。ORF 内部ではヒストンの結合量が一定に保たれていた。(図 3-E) この結果から、*fbp1* 転写抑制時のクロマチン再構築は、特定の領域から起こるのではなく、120 分程度かかる遅い反応であることが示唆された。また、YER 培地に変更後 10 分に観察された、UAS1 領域の球菌ヌクレアーゼ切断部位の消失は、クロマチン再構築によるものではなく、ヌクレオソームの配置パターンの変化によるものである可能性が考えられる。

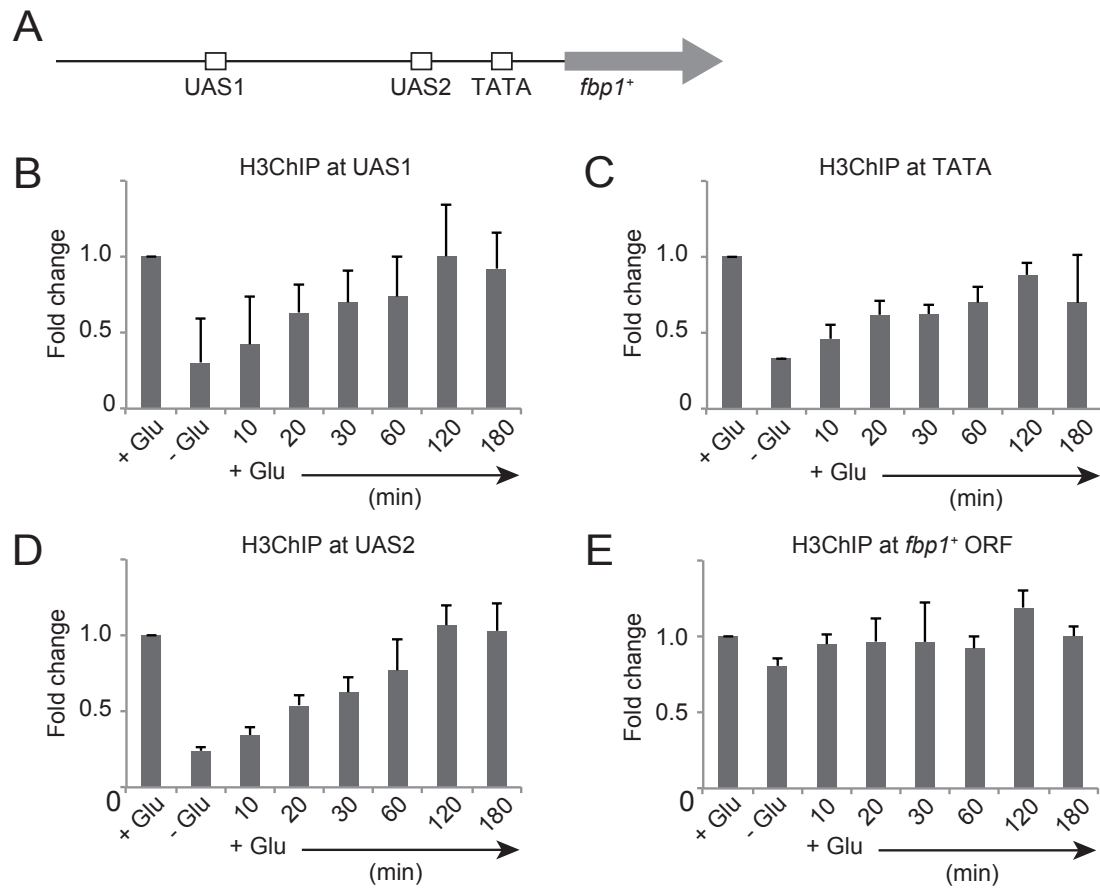


図 3 *fbp1* プロモーターへのヒストンの再結合

(A) *fbp1* 上流領域の要素と ORF の位置関係を示した。

(B~E) グルコース飢餓からグルコースの豊富な培地に移した後の、野生型におけるヒストン H3 の *fbp1* プロモーターへの結合量の解析。野生型分裂酵母を図 2-B と同じタイムコースで回収し、H3 抗体で免疫沈降した。共沈降した DNA を、(B)UAS1、(C)UAS2、(D)TATA、(E)*fbp1* ORF プライマーを用いてリアルタイム qPCR で定量した。内部コントロールとして *prp3* プライマーを用い、定量値でそれぞれ標準化した。グルコース飢餓前からの変化量をグラフに示した。

3.3 転写活性化因子の速やかな解離

次に、転写抑制時における転写活性化因子の働きを調べるため、転写活性化因子 Atf1 と Rst2 のクロマチン免疫沈降を行った。Atf1 と Rst2 はそれぞれ、UAS1 (CRE 配列) と UAS2 (STRE 配列) に結合配列を持つ¹⁸。培地中のグルコース濃度が低下すると、Atf1 は MAPK 経路によって活性化されて核内移行し、*fbp1* プロモーターに結合する^{18,23}。Rst2 は PKA 経路による抑制が解除されて核内移行し、*fbp1* プロモーターに結合する^{19,23}。また、*fbp1* の転写が活性化している時、Atf1 と Rst2 は UAS1 と UAS2 の両方に分布する²⁴。YED 培地で 3 時間培養した分裂酵母を YER 培地に移すと、Atf1 は 10 分で UAS1 から、やや遅れて UAS2 から解離した (図 4-A, B)。Rst2 は 10 分で UAS1、UAS2 から解離した (図 4-C, D)。培地中のグルコース濃度が増加すると、PKA 経路によって Rst2 が不活性化され、核外へ移行されることが知られており¹⁹、この結果と一致する。これらの結果から、グルコース飢餓ストレスがなくなると、転写活性化因子は *fbp1* プロモーター領域から速やかに解離することが示唆された。

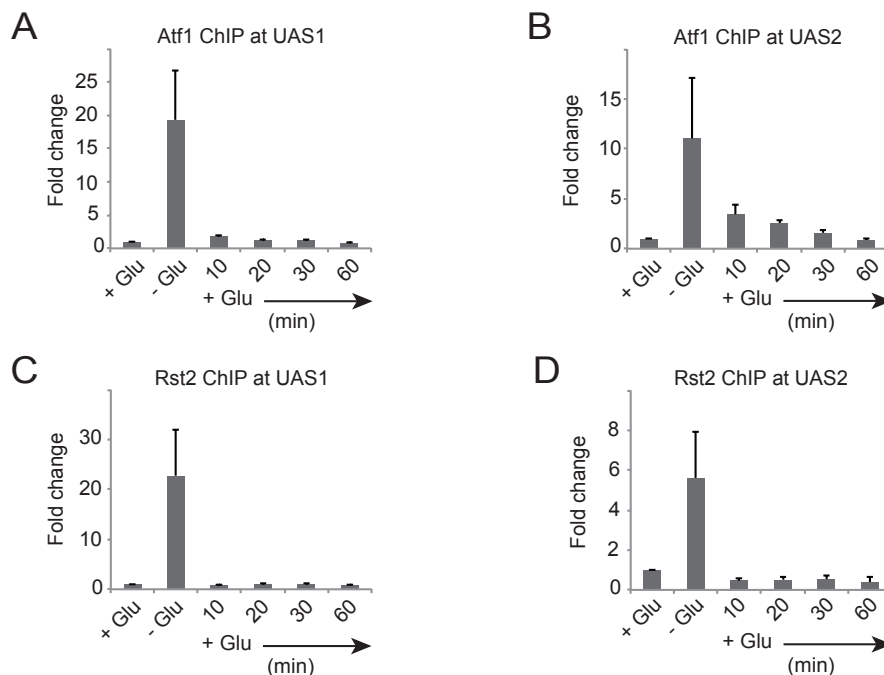


図 4 転写活性化因子の結合量変化

(A, B) 転写活性化因子 Atf1 の結合量の変化。示された時間で分裂酵母をホルムアルデヒドでクロスリンクしたサンプルに対し、Atf1 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、共沈降した DNA を (A)UAS1、(B)UAS2 プライマーでリアルタイム qPCR により定量した。内部コントロールとして *prp3* 領域を用い、それぞれ標準化した。

(C, D) 転写活性化因子 Rst2 の結合量の変化。Rst2-3Flag を発現している分裂酵母をホルムアルデヒドでクロスリンクしたサンプルに対し、DYKDDDDK 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、共沈降した DNA を (A)UAS1、(B)UAS2 プライマーでリアルタイム qPCR により定量した。内部コントロールとして *prp3* 領域を用い、それぞれ標準化した。

3.4 転写抑制因子 Tup11/12 の欠損株における転写抑制

fbp1 転写抑制時における転写抑制因子の機能を調べるため、転写抑制因子 Tup11/12 corepressors の欠損株 (*tupΔΔ*株) を用いて Northern blot を行った。野生型と比べ、グルコース飢餓時の *fbp1* mRNA 転写量は増えているが、YER 培地に移すと mRNA は減少し始め、60 分で mRNA が検出されなくなった (図 5-A)。先行研究において、*tupΔΔ* ではグルコース飢餓時の *fbp1* が野生型の 2.2 倍も発現するが、栄養増殖期ではほとんど発現していないことが既に報告されている¹⁹。また、転写活性化因子の欠損による *fbp1* の転写活性化の不良が、Tup corepressors の欠損によって回復することが報告されている²³。これらより、Tup corepressors は転写の活性化を抑制するが、転写の終結時には必要でないことが示唆された。

3.5 Tup11/12 欠損株における *fbp1* プロモーターのクロマチン再構築

次に、転写抑制時に Tup corepressors が与える、クロマチン構造への影響を調べる為に、*tupΔΔ*株を用いてクロマチン解析を行った。*tupΔΔ*株において、転写活性化因子の結合領域である UAS1 は栄養増殖期でも MNase による DNA の消化を受けやすいことが報告されている¹⁹ため、TATA box におけるクロマチン構造変化(図 5-B, 白四角)で評価する。*tupΔΔ*株において、グルコース飢餓時に開いていた TATA box は 120 分で MNase による消化を受けにくくなった (図 5-B, C)。しかし、バンドの消える速さは野生型と比べて遅かった。

このバンド消失がヌクレオソーム再構築によるものであることを確かめるため、H3 抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行った。野生型では、グルコース飢餓時において約 30% のヒストン H3 が *fbp1* プロモーター上に残っていたが、*tupΔΔ*では約 5% しか残っていなかった (図 5-D, -Glu)。しかしながら、いずれの株でも YER 培地に移して 120 分後には元の結合量まで回復した(図 5-D)。YER 培地に移してすぐのヒストンの結合量の変化をプロットし直すと、いずれの株でも一次線形近似ができ、*tupΔΔ*株でも YER 培地に移した直後からヒストン H3 の結合量が増加していた (図 5-E)。また、Tup corepressors は転写抑制因子であるにもかかわらず、グルコース飢餓時に *fbp1* プロモーターへの結合量が増大し、UAS1~UAS2 に分布することが知られている¹⁹。そこで、野生型の分裂酵母における Tup12 の結合量の変化を調べたところ、YER 培地に移して 10~20 分で *fbp1* プロモーターより解離した (図 5F, G)。これらの結果より、*fbp1* 転写抑制時には Tup corepressors が必要でないことが示された。

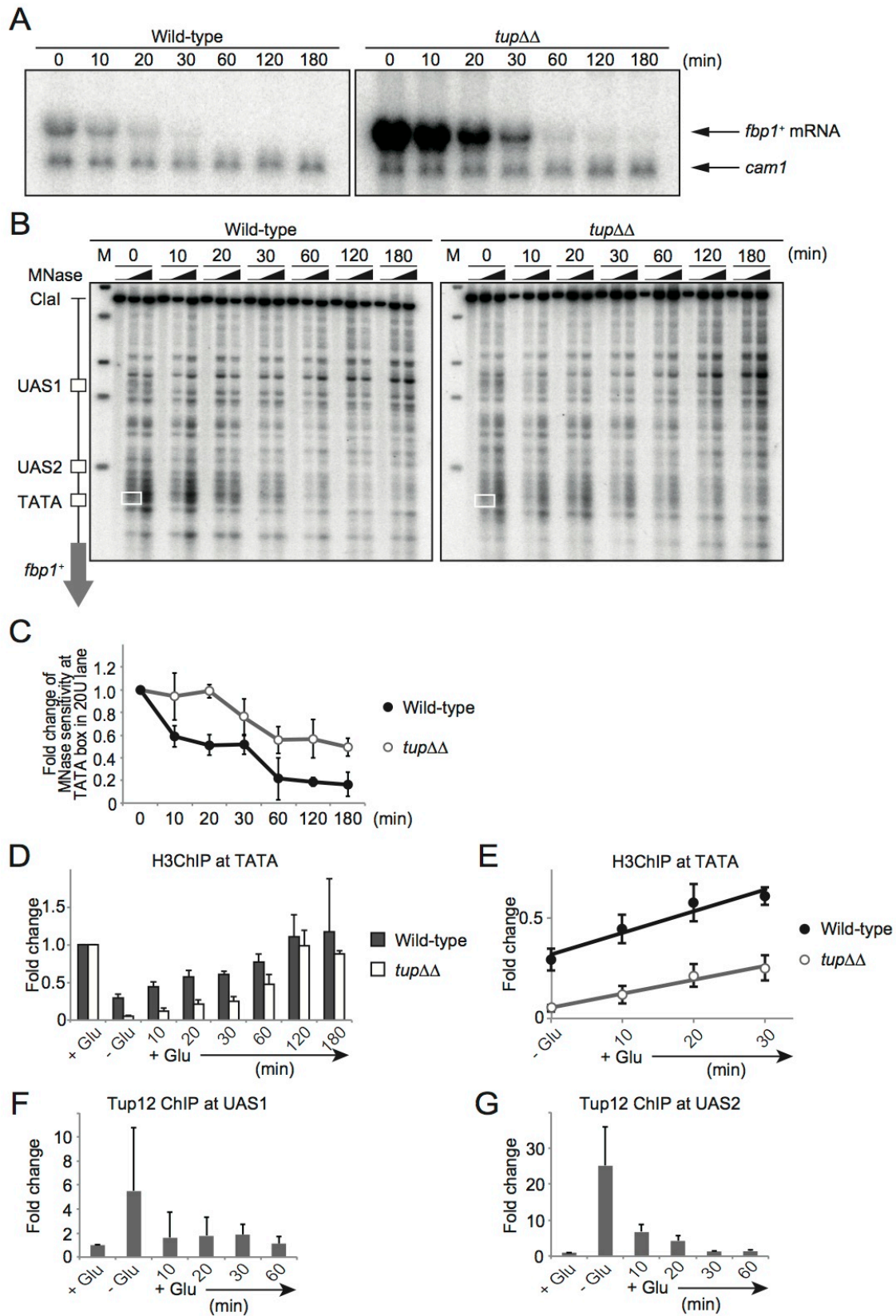


図 5 転写抑制時における Tup corepressors の機能

- (A) 野生型と *tupΔΔ* における mRNA 解析 (図 2-A と同様)。
- (B) 野生型と *tupΔΔ* におけるクロマチン解析 (図 2-C と同様)。
- (C) TATA box のクロマチン構造変化の定量結果。図 5-B の 20U のレーン全てと白四角で囲った領域のバンド定量を行い、その比を計算した。各株におけるバンド強度の 0min からの変化量をグラフに示した。
- (D) グルコース飢餓からグルコースの豊富な培地に移した後の、野生型、*tupΔΔ* におけるヒストン H3 の *fbp1* プロモーターへの結合量の解析 (図 3-E と同様)。
- (E) 図 5-D 0~30min の定量値の一次線形近似。
- (F, G) グルコース飢餓からグルコースの豊富な培地に移した後の、野生型における Tup12 の *fbp1* プロモーターへの結合量の解析。Tup12-3Flag を発現している分裂酵母をホルムアルデヒドでクロスリンクしたサンプルに対し、図 4-C, D と同様の操作を行った。

3.6 プロモーターのクロマチン構造による転写開始の阻害

fbp1 の転写が抑制され、新たな mRNA 合成が止まった後、プロモーターのクロマチン構造が完全に元の状態に戻るまで時間差がある。転写が終結した後、クロマチンが再構築されるまでの間、ストレス応答がどのように変化するのか検証した。クロマチン構造が転写開始に与える影響を調べるため、*fbp1* プロモーターのクロマチンが閉じた構造の分裂酵母と緩んだ構造の分裂酵母を用意した。前者は YER 培地で栄養増殖期の野生型分裂酵母を用い、後者は YED 培地で 3 時間培養した後で YER 培地に移し、40 分後の野生型分裂酵母を用いた。すなわち、*fbp1* の転写は終結しており、mRNA が検出できない時、かつ、プロモーターのクロマチン構造が完全には回復していない時である。この 2 つの培養液をそれぞれ YED 培地に移した。*fbp1* プロモーターのクロマチンが閉じた構造の分裂酵母では、*fbp1* の発現誘導に 60 分かかったのに対し、クロマチンが緩んだ構造の分裂酵母では *fbp1* の発現誘導に 20 分しか要しなかった (図 6, 左半分)。この結果から、プロモーターが密なクロマチン構造をとっていることで転写開始のタイミングが遅れることが示唆された。

また、クロマチン構造がストレス応答の特異性に寄与するのかどうかを検証するため、先程の 2 つの培養液を、1.2M ソルビトールを含む YE 培地に移し、高浸透圧ストレスを与えた。しかしながら、いずれの酵母においても顕著な mRNA 転写は見られなかった (図 6, 右半分)。この結果から、野生型の分裂酵母では、*fbp1* プロモーターのクロマチン構造が緩んだ状態でもストレス特異性が失われないことが示唆された。

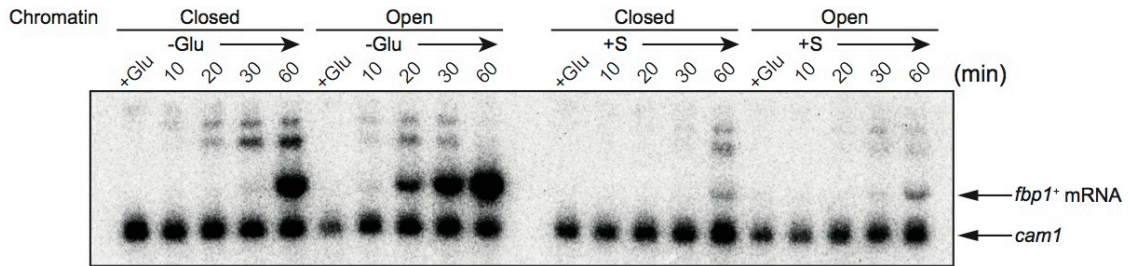


図 6 クロマチン構造の違いによる転写活性化のタイミングの変化

YER 培地で培養した分裂酵母 (Closed) と、YED 培地で 3 時間培養した後、YER で 40 分間培養した分裂酵母 (Open) をそれぞれ YED 培地、YE+1.2M Sorbitol 培地に移した時の *fbp1* mRNA 転写を Northern blot で解析した。用いたプローブは図 2-A と同様。-Glu、+S はそれぞれグルコース飢餓、ソルビトール添加を表す。

3.7 まとめと考察

本研究では、*fbp1* の転写制御をモデルとし、転写が活性化した遺伝子の転写抑制機構の一端を明らかにした。グルコースの豊富な YER 培地に酵母を移すとすぐに転写が抑制され、その後クロマチン再構築が行われるという以下のようなモデルを構築した。グルコースの枯渇した環境下では、*fbp1* プロモーターに転写活性化因子である Atf1 や Rst2、転写共抑制因子である Tup11/12 が集積しており、クロマチンは開いた構造をとっている。そして、mRNA の転写が活発に行われている (図 7i)。グルコースの豊富な環境になると、プロモーターに結合していた Atf1、Rst2、Tup11/12、RNAP II が 10 分で解離し、mRNA の転写が抑制される。このとき、転写因子群の解離によって UAS1 のヌクレオソームの配置パターンが変化する (図 7ii)。Rst2 の欠損では RNAP II や転写開始複合体の構成因子である TATA Binding Protein (Tbp1) の結合量が減少することから、Rst2 は *fbp1* の転写装置の安定性に関わっていると考えられている²³。培地中のグルコース濃度が増大し、Rst2 が解離したことで、RNAP II や Tbp1 の結合安定性が維持できずに転写が抑制され、終結したと考えられる。その後クロマチン再構築が起こり (図 7iii)、120 分かけて *fbp1* プロモーターは常態に戻る (図 7iv)。

しかしながら、出芽酵母において、ヒストンシャペロンによるクロマチン再構築が行われないと転写の抑制がかからなくなることが報告されている³。また、プロモーター上のヌクレオソームが減少し、裸の DNA が露出した時は、転写活性化因子が不在であっても、下流の転写が活性化される²⁵。このことから、分裂酵母における転写抑制とクロマチン構造の関係性は、出芽酵母とは異なることが示唆される。

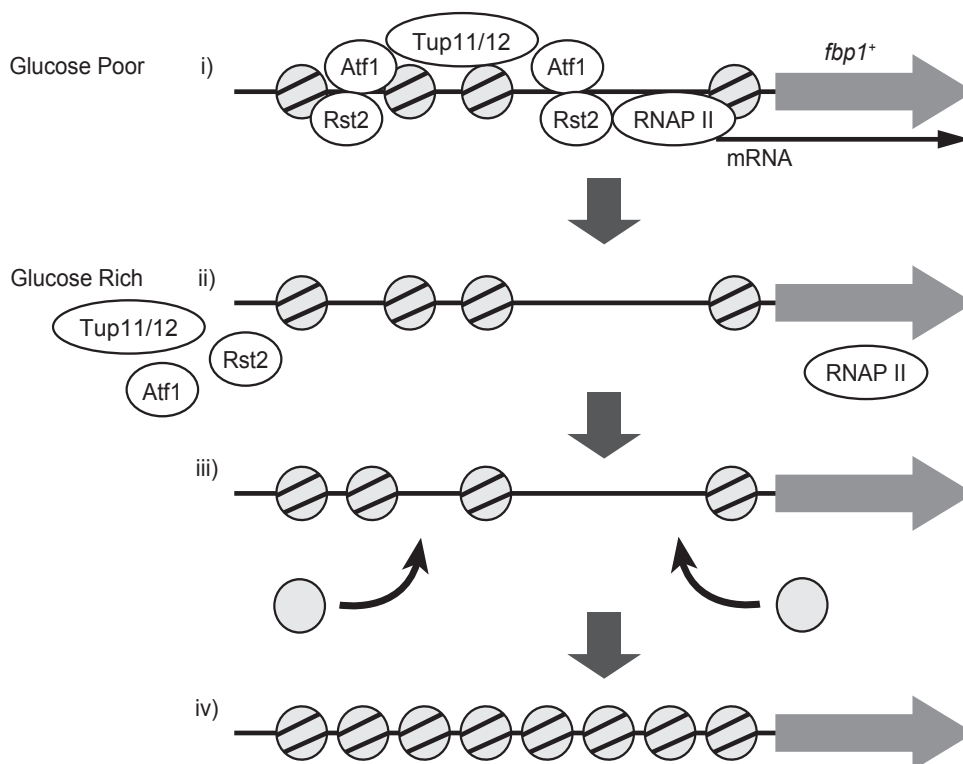


図 7 *fbp1* 転写抑制モデル

グルコース飢餓時には、*fbp1* プロモーター上に転写活性化因子や Tup corepressors、RNAP II が集積している(i)。グルコースの豊富な環境に変わって 10 分で転写因子や Tup corepressors、RNAP II が解離し(ii)、その後クロマチン再構築が起こり(iii)、120 分かけて常態に戻る(iv)。

さらに、*fbp1* の転写抑制は転写共抑制因子である Tup corepressors と独立な経路で行われることが明らかとなった。Tup corepressors の欠損はグルコース飢餓以外のストレス（窒素源飢餓や高浸透圧）で *fbp1* プロモーターのクロマチン再編成を引き起こして *fbp1* の転写を活性化し、また、グルコース飢餓時でも野生型と比較して転写量が増加する¹⁵。これらの現象から、これまで、Tup corepressors が *fbp1* プロモーターのクロマチンリモデリングを抑制することで、ストレス特異性を獲得していると考えられてきた。また、*fbp1* の転写活性化時にプロモーターへの Tup corepressors の結合量が増大することからも¹⁹、Tup corepressors は転写活性化時に抑制因子として、転写活性化因子と拮抗するのだと考えられる。他の生物種における Tup family corepressors は、出芽酵母では Tup1、ショウジョウバエでは Groucho、ヒトでは TLE と呼ばれるが、これら corepressors はヒストン脱アセチル化酵素である HDAC をリクルートし、転写抑制的なクロマチン構造へ導く^{10, 11}。しかしながら、分裂酵母ではまだ Tup corepressors (Tup11/12-Ssn6) と HDAC との相互作用は報告されていない。このことから、分裂酵母の Tup corepressors は、転写活性化状態から抑制状態にする際に働くのではなく、転写抑制状態を維持する働きを持っている可能性が考えられる。

4 参考文献

1. Karolin Luger, Mekonnen L. Dechassa and David J. Tremethick, New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **13**, 436-447, (2012)
2. Bing Li, Michael Carey, and Jerry L. Workman, The Role of Chromatin during Transcription, *Cell*, **128**, 707-719, (2007)
3. Melissa W. Adkins and Jessica K. Tyler, Transcriptional Activators Are Dispensable for Transcription in the Absence of Spt6-Mediated Chromatin Reassembly of Promoter Regions, *Molecular Cell*, **21**, 405-416, (2006)
4. Emmy P. Rogakou, Duane R. Pilch, Ann H. Orr, Vessela S. Ivanova, and William M. Bonner, DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, **273**, 5858-5868, (1998)
5. Kouji Hirota, Ken-ichi Mizuno, Takehiko Shibata, and Kunihiro Ohta, Distinct Chromatin Modulators Regulate the Formation of Accessible and Repressive Chromatin at the Fission Yeast Recombination Hotspot ade6-M26, *Molecular Biology of the Cell*, **19**, 1162-1173, (2008)
6. Toshio Tsukiyama, Jeffrey Palmer, Carolyn C. Lande, Joseph Shiloach, and Carl Wu, Characterization of the Imitation Switch subfamily of ATP-dependent chromatin-remodeling factors in *Saccharomyces cerevisiae*, *GENES & DEVELOPMENT*, **13**, 686-697, (1999)
7. Alejandra Loyola, Genevieve Almouzni, Histone chaperones, a supporting role in the limelight, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1677**, 3-11, (2004)
8. Melissa W. Adkins, Susan R. Howar, and Jessica K. Tyler, Chromatin Disassembly Mediated by the Histone Chaperone Asf1 Is Essential for Transcriptional Activation of the Yeast PHO5 and PHO8 Genes, *Molecular Cell*, **14**, 657-666, (2004)
9. Anders M. Näär, Bryan D. Lemon, and Robert Tjian, TRANSCRIPTIONAL COACTIVATOR COMPLEXES, *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 475-501, (2001)
10. Guoqing Chen, Albert J. Courey, Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression, *Gene*, **249**, 1-16, (2000)

11. Tania M. Malave and Sharon Y.R. Dent, Transcriptional repression by Tup1–Ssn6, *Biochem. Cell Biol.* **84**, 437–443, (2006)
12. Sarah R. Green, and Alexander D. Johnson, Promoter-dependent Roles for the Srb10 Cyclin- dependent Kinase and the Hda1 Deacetylase in Tup1- mediated Repression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular Biology of the Cell*, **15**, 4191–4202, (2004)
13. Judith K. Davie, Diane G. Edmondson, Cherie B. Coco, and Sharon Y. R. Dent, Tup1-Ssn6 Interacts with Multiple Class I Histone Deacetylases *in Vivo*, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, **278**, 50158–50162, (2003)
14. Yukio Mukai, Eri Matsuo, Sharon Y. Roth, and Satoshi Harashima, Conservation of Histone Binding and Transcriptional Repressor Functions in a *Schizosaccharomyces pombe* Tup1p Homolog, *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 8461–8468 (1999)
15. Kouji Hirota, Tomoko Hasemi, Takatomi Yamada, Ken-ich Mizuno, Charles S. Hoffman, Takehiko Shibata and Kunihiro Ohta, Fission yeast global repressors regulate the specificity of chromatin alteration in response to distinct environmental stresses, *Nucleic Acids Research*, **32**, 855-862, (2004)
16. Charles S. Hoffman and Fred Winston, Isolation and Characterization of Mutants Constitutive for Expression of the *fbp1* Gene of *Schizosaccharomyces pombe*, *Genetics*, **124**, 807-816, (1990)
17. Rozmin T. K. Janoo, Lori A. Neely, Burkhard R. Braun, Simon K. Whitehall and Charles S. Hoffman, Transcriptional Regulators of the *Schizosaccharomyces pombe* *fbp1* Gene Include Two Redundant Tup1p-like Corepressors and the CCAAT Binding Factor Activation Complex, *Genetics*, **157**, 1205–1215 (2001)
18. Lori A. Neely and Charles S. Hoffman, Protein Kinase A and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Antagonistically Regulate Fission Yeast *fbp1* Transcription by Employing Different Modes of Action at Two Upstream Activation Sites, *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 6426–6434, (2000)
19. Kouji Hirota, Charles S. Hoffman, and Kunihiro Ohta, Reciprocal Nuclear Shuttling of Two Antagonizing Zn Finger Proteins Modulates Tup Family Corepressor Function To Repress Chromatin Remodeling, *Eukaryotic Cell*, **5**, 1980–1989, (2006)
20. Kouji Hirota, Charles S. Hoffman, Takehiko Shibata and Kunihiro Ohta, Fission Yeast Tup1-Like Repressors Repress Chromatin Remodeling at the *fbp1*⁺ Promoter and the *ade6-M26* Recombination Hotspot, *Genetics*, **165**, 505–515 (2003)

21. David S. Mcnabb, Kelly A.-S. Tseng, and Leonard Guarente, The *Saccharomyces cerevisiae* Hap5p Homolog from Fission Yeast Reveals Two Conserved Domains That Are Essential for Assembly of Heterotetrameric CCAAT-Binding Factor, *Molecular and Cellular Biology*, **17**, 7008–7018, (1997)
22. Kouji Hirota, Tomoichiro Miyoshi, Kazuto Kugou, Charles S. Hoffman, Takehiko Shibata & Kunihiro Ohta, Stepwise chromatin remodelling by a cascade of transcription initiation of non-coding RNAs, *Nature*, **456**, 130-135, (2008)
23. Ryuta Asada, Naomichi Takemata, Charles S. Hoffman, Kunihiro Ohta, Kouji Hirota, Antagonistic Controls of Chromatin and mRNA Start Site Selection by Tup Family Corepressors and the CCAAT-Binding Factor, *Molecular and Cellular Biology*, **35**, 847– 855, (2015)
24. 浅田隆大, 転写活性化因子と抑制因子によるクロマチン構造の拮抗的な制御が mRNA の転写開始点を決定する, 首都大学東京 理工学研究科 分子物質化学専攻 修士論文, (2015)
25. Zheng Hu, Kaifu Chen, Wei Li & Jessica K Tyler, A matter of access, *Transcription*, **5**, e29355-1-5, (2014)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻をいただきました、首都大学東京 理工学研究科 分子物質科学専攻 生物化学研究室 廣田耕志教授に心から深く感謝いたしますとともに、厚く御礼申し上げます。

また、一方ならぬご協力をいただきました、首都大学東京 理工学研究科 分子物質科学専攻 生物化学研究室内の田岡万悟准教授、阿部拓也助教、柴田武彦客員教授、照喜名悟郎博士、八巻優佳博士、佐藤亘博士、中川万紀子氏、浅田隆大氏、高沢浩則氏、早川健太郎氏、藤井稔彦氏、上原清孝氏、川澄遼太郎氏、小林香氏、添野公雄氏、高木季代氏、足立朗氏、石川大輔氏、大岡正人氏、清水直登氏、鍛冶田絹美氏、小林宏次氏、小山慎司氏、中里亜利咲氏、梅村小雪氏、鈴木雄也氏、千松賢史氏に謝意を申し上げます。

最後に、研究生生活を精神的、経済的に支えていただいた両親に深く感謝いたします。